

JP 49-31843 A

Best Available Copy

Application No.: 47-72606

Filing Date: July 21, 1972

5 Publication Date: March 22, 1974

Applicant: Noda Institute for Scientific Research

Title of the Invention:

PROCESS FOR PRODUCING SOYBEAN 7S PROTEIN

Claim:

10 A process for producing soybean 7S protein
characterized in that soybean globulin or a material
containing it is dispersed and dissolved in a solution
containing 0.5 to 0.8 mol of sodium chloride or potassium
chloride at pH 1.2 to 4.0, an insoluble fraction is removed,
15 and, if necessary, the resultant is subject to gel
filtration and freeze-drying.



特



許

願

昭和47年7月1日

特許庁長官 三宅 幸夫 殿

1 発明の名称

大豆7S蛋白質の製造法

2 発明者

住所 千葉県野田市宮崎10番地
氏名 野山 育則 (姓か/名)

3 特許出願人

郵便番号 278

住所 千葉県野田市野田399番地
氏名 財団法人 野田産業科学研究所
理事長 茂木 啓三郎

47 072606

明 細 書

1 発明の名称 大豆7S蛋白質の製造法

2 特許請求の範囲

大豆グロブリンまたはその含有物をpH 1.2〜4.0で0.5〜0.8モルの塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含む溶液に分散、溶解させたのち、不溶性区分を除去し、必要に応じてゲル濾過、凍結乾燥することを特徴とする大豆7S蛋白質の製造法。

3 発明の詳細な説明

本発明は大豆7S蛋白質の製造法に關し、その目的とするところは大豆グロブリンまたはその含有物より、大豆7S蛋白質を極めて簡易な操作で、しかも収率よく製造する方法を提供することにある。

大豆グロブリンは大豆に含まれる蛋白質の約90%を占めることが従来より知られており、また1955年にナイスミス(Naismith)等は大豆蛋白質を超速心分析法により解析した結果、大豆

① 日本国特許庁

公開特許公報

⑪特開昭 49 31843

⑬公開日 昭49.(1974)3 22

⑫特願昭 47-72606

⑭出願日 昭47.(1972)7.21

審査請求 有 (全4頁)

庁内整理番号

⑤日本分類

7048 49
6762 4934 C0
16 F71

蛋白質は2S、7S、11S、15Sの沈降定数を持ち、少なくともこれらの4成分から構成されていることが明らかとなつた。これらの沈降成分のうち、7S、11Sの2成分が大豆グロブリン中で占める割合は約70%に相当し、また7Sと11Sの含有比率は大豆の品種等により異なることも知られている。(W. J. Wolf, H. E. Babcock and A. K. Smith, Nature Vol. 191, 1395 (1961))

さらに7S沈降成分の70〜75%はイオン強度0.5の溶液(pH 7.6で0.01モル・リン酸緩衝液に0.4モルの食塩を溶かした溶液)中で、7Sの沈降定数を示すが、一方イオン強度0.1の溶液(pH 7.6で0.01モル・リン酸緩衝液)に於いて、9Sの沈降定数を示す成分に変化する特性を有するため、この7S成分は大豆蛋白質の主要な7S成分であり、大豆7S蛋白質と呼ばれている。

これまで数多くの研究者等が大豆類より得た蛋白質を人肉、豆腐類または新しい蛋白質食品類の

Best Available Copy

特開昭49-31843(2)

製造原料として用いるため、大豆蛋白質の大半を占める7S、11S蛋白質の諸物性の探求を種々試みてはいるが、今なお7S、11S両蛋白質を純粋に、しかも効率よく製造する方法はほとんど開発されていない。

就中、蛋白質の分離、精製工程が著しく複雑にして困難な7S蛋白質を簡単な操作で、純粋よく、しかも高収率で製造できる方法の開発が強く要望されているのが実情である。

そこで本発明者等は大豆蛋白質特有な溶解pHとイオン強度を適宜組み合わせることにより、大豆7S蛋白質を効率よく、しかも大規模に製造可能な方法について種々研究を重ねた結果、7S蛋白質は大豆グロブリンの等電点(pH 4.5)より酸性領域に於いてイオン強度0.5~0.8で完全に溶解するのに対して、11S蛋白質はイオン強度0.5以上では完全に沈殿すること、さらに7S蛋白質はpH 7.6でイオン強度0.5~0.1への変化に対し、7Sから9Sへ定量的に沈降定数の変化を示すことから、未変性のままで存在すること

丸大豆、脱脂大豆をそのまま用いる場合には30メッシュより小さな粒子に粉砕して用いるのが好ましい。

まず、大豆グロブリンまたはその含有物を、0.5~0.8モルの食塩または塩化カリウム(イオン強度0.5~0.8に相当する)を含む酸性溶液(pH 1.5~2.5)に室温で約1~2時間攪拌しながら分散、溶解する。この場合添加する酸性溶液の量は、5~10倍量(V/W)が好ましい。

つぎに、前記溶解液にpH調整剤(稀薄な塩酸、リン酸、硫酸等の溶液)を加えて、溶液のpHを1.2~4.0、最も好ましくは1.5~2.5に調節したのち、遠心分離して不溶性区分(沈降部)に含まれる11S、15S蛋白質を除去する。

この場合、遠心分離は20,000~30,000 r.p.mで20~30分間行なうのがよい。

前記のごとくして得られた可溶性区分(上清部)より大豆7S蛋白質を製造するには、可溶性区分をそのまま濃縮して製品としてもよいが、精製大豆7S蛋白質を所望する場合には、以下に記載

等の知見を得て本発明を完成した。

すなわち、本発明は大豆グロブリンまたはその含有物をpH 1.2~4.0で0.5~0.8モルの塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含む溶液に分散、溶解させたのち、不溶性区分を除去し、必要に応じてゲル濾過、凍結乾燥することを経験とする大豆7S蛋白質の製造法である。

本発明方法によれば、まず簡易な操作で、しかも短時間に7S蛋白質を得ることができ、さらに原料として用いる大豆グロブリンまたはその含有物の全7S沈降成分の約60%以上が回収され、しかも全く純粋な7S蛋白質を製造し得る等の利点がある。

以下本発明方法を具体的に説明する。

本発明の原料として用いられる大豆グロブリンまたはその含有物は、たとえば丸大豆、脱脂大豆、またはこれらのものを水、微アルカリ水、食塩水、塩化カリウム水等により抽出して得た液、あるいはこれらの抽出液をpH 4.5付近で等電沈降して得た大豆グロブリン(酸沈降蛋白)等である。

する精製工程を行なう。

すなわち前記可溶性区分を、0.4モルの食塩を含む0.01モル・リン酸緩衝液(pH 7.6)に対して透析したのち、これを分子ふるい膜に通過させて濃縮液を得る。

本発明に用いられる分子ふるい膜としては、ダイヤフロ膜(米国、アミコン社製)、コロジオン膜(西ドイツ国、ザルトリウス・メンブランフィルムター社製)等である。

前記濃縮液をゲル濾過し、7S蛋白質の溶出部を分取したのち、これを水で透析する。

さらに、この液を常法により凍結乾燥して精製大豆7S蛋白質を得る。

なお本発明に於けるゲル濾過法としては、たとえばセファデックスG-75、G-100、G-150(スウェーデン国、ファーマシヤ社製)、またはバイオゲルP-60、P-100、P-150(米国、バイオラッド社製)等が用いられる。

本発明方法により得られた大豆7S蛋白質は、

特開昭49-31843(公)

常法の超速心分析法（坪風館、生物物理化学実験法、9～29頁、（1962）記載の方法）で測定した結果、7Sの沈降定数を持つ単一の沈降パターンを示し（第1図-A）、pH 7.6でイオン強度0.5から0.1への変化に対し、7Sから9Sへ沈降定数が変化する（第1図-B）。さらにディスク電気泳動法（B. J. Davis, Ann. New York Acad. Sci. 121, 404, （1964）記載の方法）で測定した結果、均一なバンドを示し電気泳動的にも均一である（第2図）。

またこの大豆7S蛋白質の分子量は、ヨフアンティス（Yphantis）法（Ann. New York Acad. Sci. 88, 586（1960）記載の方法）によると約180,000である。

つぎに本発明の実施例を挙げて説明する。

実施例1

脱脂大豆150gを水抽出し、常法による等電沈降処理して得た大豆グロブリン50gを0.6モルの塩化ナトリウムを含む0.01モル塩酸溶液（pH 2.0）500mlに分散、溶解し、1規定塩

脱脂大豆100gを、0.5モルの塩化ナトリウムを含む0.01モル塩酸ナトリウム-塩酸緩衝液（pH 1.8）1.5ℓに分散、溶解したのち、ゆるやかに室温で1時間攪拌する。この分散、溶解液を20,000 r.p.mで30分間、遠心分離しそのち、上清液を水で透析し、凍結乾燥して92g（水分、7.5%）の大豆7S蛋白質製品を得た。

得られた製品の7S蛋白質含量は87.1%であった。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明方法により製造された大豆7S蛋白質の超速心沈降図である。第1図-Aは0.4モルの塩化ナトリウムを含む0.01モル・リン酸緩衝液、pH 7.6（イオン強度 0.5）の溶液中での沈降図である（ $\frac{0.50\%}{20, w} = 7.50 S$ ）。第1図-Bは0.01モル・リン酸緩衝液、pH 7.6（イオン強度 0.1）の溶液中での沈降図である（ $\frac{0.50\%}{20, w} = 10.65 S$ ）。第1図は、いずれも51,200 r.p.m、20℃、40分後の沈降図である。

液でpH 2.0に調整したのち、室温で1時間ゆるやかに攪拌し分散、溶解を充分に行なり。

この分散、溶解液を30,000 r.p.mで20分間遠心分離したのち、沈降区分を除去し、上清液を0.4モルの塩化ナトリウムを含む0.01モル・リン酸緩衝液（pH 7.6）で透析し、つづいてコロジオン膜（西ドイツ国、ザルトリウス・メンブランフィルター社製）を用いて透析内液を約50mlに濃縮する。しかるのち、この緩衝液で十分に緩衝化し3×70cmのカラムに充填したセファデックスG-100（スウェーデン国、ファーマンヤー社製）で前記濃縮液をゲル濾過し、第3図に示した斜線の7S溶出区分を水に透析したのち、凍結乾燥して10.6g（水分7.8%）の精製大豆7S蛋白質を得た。

得られた大豆7S蛋白質は超速心分析法およびディスク電気泳動法に於いても均一であつた。また大豆7S蛋白質の収率は大豆グロブリン中の全7S成分の70.0%であつた。

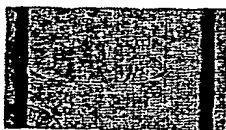
実施例2

第2図は、精製された大豆7S蛋白質のディスク電気泳動図である。なお電気泳動条件はpH 8.90、アクリルアミドゲル濃度6.3%、ディスクカラム1本当たり2mA、3時間30分で電気泳動した図である。

第3図は、本発明方法により得られた大豆7S蛋白質濃縮物を3×70cmのカラムに充填したセファデックスG-100で、ゲル濾過した時に得られた溶出図である。図面の縦軸は280mμの吸光値（O.D）であり、横軸はフラクション番号である。なおフラクションコレクターによる溶出液の分取量（1本当たり）は570mlである。

特許出願人 財団法人 野田産業科学研究所

第1図-A



第1図-B



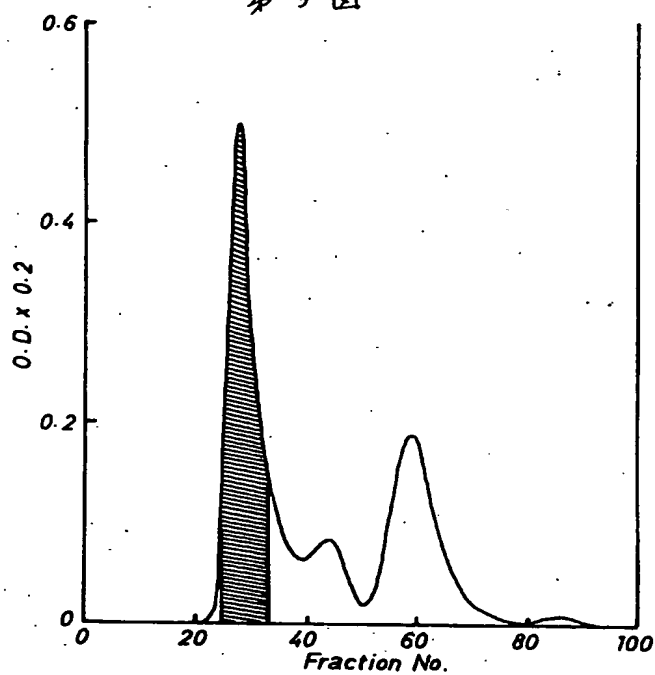
第2図



⊖

⊕

第3図



4. 添付書類の目録

- | | |
|-------------|-----|
| (1) 明 細 書 | 1 通 |
| (2) 図 面 | 1 通 |
| (3) 願 書 副 本 | 1 通 |

5. 前記以外の発明者

(1) 発 明 者

住 所 ノ ダ シ シ ミズ
イ 千 葉 県 野 田 市 洲 水 6 8 3
氏 名 井 口 信 義